



B1 17
P01 1

PCT

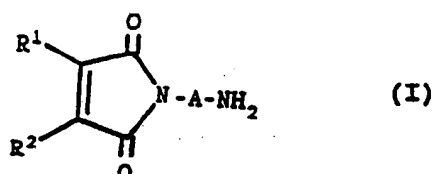
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C07D 207/452, G01N 33/535 G01N 33/547		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/15798 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Dezember 1990 (27.12.90)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/00957 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. Juni 1990 (16.06.90) (30) Prioritätsdaten: P 39 19 915.0 19. Juni 1989 (19.06.89) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HUBER, Erasmus [DE/DE]; St. Willibald 10, D-8911 Unterfinning (DE). KLEIN, Christian [DE/DE]; Blütenstr. 16, D-8120 Weilheim (DE). BATZ, Hans-Georg [DE/DE]; Traubinger-Str. 63, D-8132 Tutzing (DE). ZINK, Bruno [DE/DE]; Seeblickstr. 4, D-8114 Uffing (DE).		(74) Anwälte: DAUM, Martin usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent)*, DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	

(54) Title: AMINOALKYL MALEIMIDES AND HAPTENE AND ANTIGEN DERIVATIVES THEREOF AND CONJUGATES WITH PEPTIDES OR PROTEINS

(54) Bezeichnung: AMINOALKYLMALEIMIDE UND DAVON ABGELEITETE HAPTEN- UND ANTIGENDERIVATE SOWIE KONJUGATE MIT PEPTIDEN ODER PROTEINEN



(57) Abstract

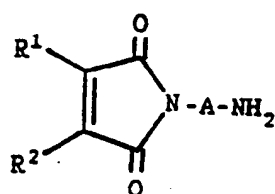
The invention relates to novel aminoalkyl maleimides of general formula (I) in which R₁ and R₂ are the same or different and represent hydrogen or a C₁-C₄ alkyl group and A is a straight or branched-chain, saturated or unsaturated alkylene chain with 2 to 6 carbon atoms, possibly interrupted by an oxygen or sulphur atom or carbonyl group, and their corresponding acid addition salts. The present invention also relates to the amidoalkyl maleimide derivatives formed from compounds of general formula (I) and immunological conjugates which may be produced by the conversion of amidoalkyl maleimide derivatives with peptides or proteins. The object of this invention is also the corresponding processes for making the compounds of the invention and the use of these conjugates in diagnostic determination methods, especially immunoassays.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Aminoalkylmaleimide der allgemeinen Formel (I), in der R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C₁-C₄-Alkylgruppe darstellen, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder Carbonylgruppe unterbrochene Alkylenkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, sowie deren entsprechende Säureadditionssalze. Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die aus Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und immunologischen Bindungspartnern gebildeten Amidoalkylmaleimid-Derivate. Außerdem betrifft die Erfindung immunologische Konjugate, die durch Umsetzung der Amidoalkylmaleimide-Derivate mit Peptiden oder Proteinen hergestellt werden können. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die entsprechenden Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen, sowie die Verwendung dieser Konjugate in diagnostischen Bestimmungsmethoden, insbesondere in Immunoassays.

Aminoalkylmaleimide und davon abgeleitete Hapten- und Antigenderivate sowie Konjugate mit Peptiden oder Proteinen

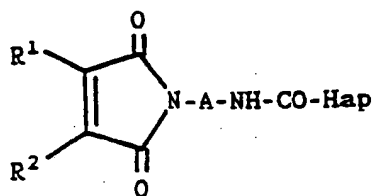
Die Erfindung betrifft neue Aminoalkylmaleimide der allgemeinen Formel I



(I),

in der R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe darstellen, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder eine Carbonylgruppe unterbrochene Alkylenkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, sowie deren entsprechenden Säureadditionssalze, mit Ausnahme der Verbindung N-6-Aminohexylmaleimid.

Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die aus Verbindungen der allgemeinen Formel I und immunologischen Bindungspartner gebildeten Amidoalkylmaleimid-Derivate der allgemeinen Formel II



(II),

in der R_1 , R_2 und A die oben angegebenen Bedeutungen haben und Hap, der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen bzw. aktivierte Carboxylgruppen tragenden immunologischen Bindungspartner durch Amidierung gebildete Rest ist. Als immunologische Bindungspartner kommen beispielsweise Haptene oder Antigene in Frage.

eignet sich die Hydroxysuccinimidogruppe bevorzugt zur Reaktion mit Verbindungen, die eine Aminogruppe enthalten. Auf diese Weise lassen sich auf elegante Art und Weise zwei Komponenten bzw. Verbindungen miteinander verknüpfen, wobei die eine beispielsweise eine Sulfhydrylgruppe enthält und die andere eine Aminogruppe. In analoger Weise dienen die homobifunktionellen Reagenzien, die zwei chemisch gleichartige reaktive Gruppen enthalten, zur Verknüpfung von Komponenten mit identischen funktionellen Gruppen, wie beispielsweise im obigen Fall von Sulfhydrylgruppen.

Je nach Eigenschaft der miteinander zu verknüpfenden Komponenten kommen demnach eine Reihe von solchen bifunktionellen Reagenzien zum Einsatz (Kia-ki Han et al., Int. J. Biochem. 16 (2), 129 - 145 (1984) und R.E. Feeney, Int. J. Peptide Protein Res. 29, 1987, 145 - 161). So ist beispielsweise in Arch. Biochem. Biophys. 203, 774 (1980) die Verwendung von N-6-Aminohexylmaleimid zur Herstellung einer modifizierten Agarose-Festphase für die Affinitätschromatographie beschrieben.

Aus dem Stand der Technik, wie z.B. der europäischen Patentanmeldung EP-A-0,142,193, ist ferner die Herstellung von Immunogenen bekannt, wobei geeignete Antigene, wie Polypeptide, Oligosaccharide oder Oligonukleotide, an reaktive Gruppen von hydrophoben Verbindungen, wie z.B. Phospholipide, gebunden werden, die durch mindestens eine Gruppe von Glykosiden, vorzugsweise Saponine, mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil komplexiert werden. Im speziellen ist in Beispiel 4 dieser europäischen Patentanmeldung ein β -Endorphin-Derivat beschrieben, in dem eine Aminosäure dieses Dodecapeptids durch eine Maleimido-butylamin-gruppe modifiziert ist. Die Anmeldung enthält jedoch keinerlei Angaben, wie ein derartiges Derivat hergestellt werden kann.

Ein weiteres Anwendungsgebiet bifunktioneller Reagenzien ist die Herstellung von Reagenzien für die klinische Diagnostik. Hierbei werden in zunehmendem Maße Bestimmungsverfahren nach dem Prinzip der Immunoassays durchgeführt, die sich durch besonders hohe Empfindlichkeit auszeichnen. Dabei werden oft Konjugate z.B. aus einem Markierungsenzym und einer zu bestimmenden Substanz, dem

Das bei der immunologischen Bestimmungsmethode verwendete Testsystem enthält außerdem einen den jeweiligen Analyten spezifisch Immunogen erkennenden Antikörper. Hierbei differenziert der Antikörper in der Regel nicht zwischen freien und kovalent an den Enzymdonor gebundenen Analyten. Der Antikörper ist in einer Menge vorhanden, die ausreicht, um die im Testsystem vorliegenden mit dem Analyten modifizierten Enzymdonor-Konjugate vollständig zu binden. Dadurch wird die spontane Assoziation des Enzymdonors und des Enzymakzeptors zum aktiven Enzym verhindert.

Die Reaktion zur Bestimmung der Konzentration eines Analyten wird nun derart durchgeführt, daß eine definierte Menge der zu bestimmenden Probe zu dem oben beschriebenen Testsystem zugefügt wird. Da es sich bei diesem Reaktionstyp um einen kompetitiven Test handelt, binden die vorhandenen Antikörper, die gegen den Analyten gerichtet sind, sowohl die aus der Probe kommenden freien Analyten als auch einen Teil der mit dem Analyten markierten Enzymdonoren. Der durch die Verdrängungsreaktion durch den freien Analyten ausgelöste freie Anteil des markierten Enzymdonors assoziiert dann spontan mit dem Enzymakzeptor zum enzymatisch aktiven β -Galaktosidase-Tetramer, dessen Konzentration direkt proportional zu der Konzentration des aus der Probe stammenden Analyten ist. Die Menge bzw. die volumenspezifische Aktivität des durch diese spontane Assoziation gebildeten Enzyms β -Galactosidase wird durch Hydrolyse eines geeigneten Enzymsubstrates, beispielsweise von o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid oder Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid und Freisetzung des entsprechenden Chromophors gemessen.

Bei der oben dargestellten erforderlichen Verknüpfung zwischen Immunogen (Analyt) und Enzymdonor besteht das Problem, daß die Modifizierung des Enzymdonors nur an solchen Stellen im Molekül erfolgen darf, die für die Erkennung zwischen Enzymdonor und Enzymakzeptor nicht von Bedeutung sind. Ansonsten wäre die Assoziation zum enzymatisch aktiven Enzymkomplex gestört und der gemessene Wert für das zu bestimmende Hapten würde ein falsches Ergebnis vortäuschen.

führen zu unerwünschten Reaktionsmischungen, die häufig schwierig zu trennen sind. Höchste Reinheit der hergestellten Konjugate ist jedoch erforderlich, um durch Immunisierung Antikörper mit möglichst hoher Spezifität und geringer Kreuzreaktivität zu erhalten.

Es bestand daher die Aufgabe, neue bifunktionelle Reagenzien zur Verfügung zu stellen, die die oben genannten Nachteile nicht aufweisen.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I als heterobifunktionelle Reagenzien vorteilhaft eingesetzt werden können. Insbesondere hat sich gezeigt, daß die zwischen der Maleimido- und der Aminogruppe befindliche Gruppe A für eine geringe Kreuzreaktivität der mit Hilfe der Hapten-Peptid-Konjugate hergestellten Antikörper verantwortlich ist. Dies trifft insbesondere zu für die kurzkettigen Derivate mit einer Kettenlänge in A von 2-5, insbesondere 2, 3 oder 4 Atomen.

R^1 und R^2 in der Formel I können gleich oder verschieden sein und jeweils ein Wasserstoffatom oder eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe, wie z.B. die Methyl-, Ethyl- oder Isopropylgruppe bedeuten. Bevorzugt stellen R^1 und R^2 jedoch ein Wasserstoffatom dar.

Die Gruppe A bedeutet eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylengruppe mit 2-6, vorzugsweise 2-4 C-Atomen, die gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder durch eine Carbonylgruppe unterbrochen sein kann. In diesem Sinne kommen beispielsweise die folgenden Bedeutungen in Frage:
 $A = -(CH_2)_n-$; $-(CH_2)_m-CH(CH_3)-(CH_2)_o-$; $-(CH_2)_m-C(CH_3)_2-(CH_2)_o-$; $-(CH_2)_m-X-(CH_2)_o-$ mit $X=O, S, CO$; $-(CH_2)_m-CH=CH-$ mit $n=2-6$ und $m+o=1-4$ und $m+o=2-5$. Bevorzugt bedeutet A die Gruppen $-(CH_2)_n-$ mit $n=2, 3, 4$ oder 5 und $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-S-CH_2-$, $-CH_2-CO-CH_2-$.

Säureadditionssalze der Amine sind Salze mit organischen oder anorganischen Säuren, wie z.B. Essigsäure oder Salzsäure.

Die Umsetzung der Verbindungen der Formel IV mit Verbindungen der Formel V werden vorzugsweise in basischen Lösungen bei Temperaturen von - 20 °C bis + 80 °C durchgeführt. Als reaktive Gruppe Z kommen solche in Frage, die sich durch Umsetzung mit Aminen leicht abspalten lassen, wie z.B. Alkoxycarbonylgruppen, beispielsweise die Ethoxycarbonylgruppe.

Die neuen Verbindungen der Formel I finden als heterobifunktionelle Reagenzien insbesondere zur Herstellung von Konjugaten Verwendung. Als Konjugate kommen beispielsweise Hapten-Peptid-, Hapten-Protein-, Antigen-Peptid-, Antigen-Protein- oder Antikörper-Effektor-Konjugate in Frage. Im Fall der Antikörper-Effektor-Konjugate wird beispielsweise ein Antikörper kovalent an ein Effektormolekül gebunden, wobei der Effektor ein Analyt, Wirkstoff, Toxin oder auch ein signalproduzierendes Enzym sein kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel II, in der Hap repräsentativ für einen Bindungspartner steht, der sich als Analyt zum Einsatz bei immunologischen Bestimmungsverfahren eignet. Solche Bindungspartner sind beispielsweise Haptene oder Antigene, die mindestens eine Carboxylgruppe tragen, oder in ein carboxylgruppentragendes Derivat überführt wurden, wie z.B. die Haptene Cortisol, Theophyllin oder Digoxigenin. Antigene können Proteine oder Peptide sein. Es kommen jedoch prinzipiell für die Gruppe Hap alle solche Substanzen in Frage, für die spezifisch gegen sie gerichtete Antikörper gewonnen werden können. Insbesondere geeignet sind solche, die zur Durchführung von Bestimmungsmethoden nach der oben beschriebenen CEDIA-Technik verwendbar sind. Diese Substanzen können insbesondere Analyte sein, d.h. solche Verbindungen, die im Serum von Patienten vorkommen und deren Bestimmung von diagnostischem Interesse ist.

Carboxylgruppe kann in freier Form vorliegen oder in Form von aktivierten Derivaten, wie beispielsweise Anhydriden, Estern oder Amiden. Es ist jedoch auch möglich, solche Haptene als Bindungspartner einzusetzen, die ursprünglich keine Carboxylgruppe enthielten, wenn durch chemische Modifizierung die entsprechende Carboxylgruppe nachträglich in das Hapten eingeführt wird. Entsprechende Modifizierungsreaktionen sind aus dem einschlägigen Stand der Technik bekannt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Verbindungen der allgemeinen Formel II zur Verfügung gestellt, in denen das Hapten ein Steroidhormon ist. Der Nachweis von Steroidhormonen, wie z.B. Östrogen, Testosteron, Cortisonen und Herzglycosiden, denen alle das Steroidgrundgerüst gemeinsam ist, spielt in der Diagnostik eine bedeutende Rolle. Die Zurverfügungstellung von Antikörpern gegen Steroidhormone bzw. gegen die entsprechenden Hapten-Peptid-Konjugate für die Durchführung von Immunoassays ist daher wünschenswert.

Es hat sich erwiesen, daß durch die Derivatisierung der Haptene zu den Verbindungen der allgemeinen Formel II das Epitop des Haptens nicht beeinträchtigt wird, so daß ein gegen das jeweilige in der zu bestimmenden Probe vorhandene freie Hapten gerichteter Antikörper auch das entsprechend modifizierte Hapten-Peptid-Konjugat in gleichem Maße erkennt.

Ebenso hat sich gezeigt, daß die derivatisierten Hapten-Peptid-Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der Formel II mit sulfhydrylgruppenhaltigen Peptiden oder Proteinen erhalten werden, ohne weitere Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften mit dem Enzymakzeptor EA zu den Tetramer-Komplexen der β -Galactosidase assoziieren. Diese wiederum zeigen durch die im Prinzip vorhandene Derivatisierung des Enzyms keine nachteilige Beeinflussung der enzymatischen Aktivität, und spalten die in Frage kommenden Substrate in gleicher Weise wie die unmodifizierte β -Galactosidase.

- 13 -

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Konjugate, die durch Umsetzung der Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden und Proteinen hergestellt werden können. Als Peptide und Proteine kommen vorzugsweise solche in Frage, die eine Sulfhydrylgruppe bzw. eine Cysteingruppe enthalten, die mit der Maleimidogruppe der Verbindungen der Formel II reagieren. Die Herstellung solcher Derivate erfolgt nach an sich bekannten Methoden der chemischen Modifizierung von Proteinen. Vorzugsweise werden jedoch Peptide, insbesondere die in der oben beschriebenen CEDIA-Technik verwendbaren Enzymdonatoren ED eingesetzt. Die Modifizierung von Peptiden oder Proteinen erfolgt nach an sich bekannten Verfahren in geeigneten Puffern, z.B. Phosphatpuffer, bei Temperaturen zwischen 0°C und 40°C, vorzugsweise bei 15-25°C, durch Inkubation mit Verbindungen der Formel II über einen Zeitraum von 1-24h. Die Herstellung verschiedener ED-Derivate ist aus US 4,708,929 bzw. Clin. Chem. 32 (9), 1986, 1637 - 1641 bekannt, bzw. sind bei Microgenics Corp., Concord, California (USA) erhältlich.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Hapten-Peptid-Konjugates bei der Durchführung von Immunoassays.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung anhand von konkreten Ausführungsbeispielen:

Ausbeute: 11.6 g (entspr. 44% d. Th. bez. auf die Di-tert.-butyl-dicarbonat).

DC: Kieselgel, Methanol/Chloroform/Ammniak 45/45/10 (v/v/v)
Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); $R_f=0.65$.

Beispiel 2

a) N-(tert-Butyloxycarbonyl)-2-(N-maleinimido)ethylamin

0.8 g (5 mmol) der nach Beispiel 1a hergestellten Verbindung löst man in 25 ml gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung. Die Lösung wird über ein Falten-filter filtriert und auf 0°C gekühlt. Anschließend gibt man unter Rühren 0.84 g (5 mmol) N-(Ethoxycarbonyl)maleinimid (hergestellt nach der Methode von O. Keller und J. Rudinger, Helv.Chim.Acta 58 (1975), 531-541) zu und läßt 15 min bei Raumtemperatur weiterrühren. Hierbei löst sich das N-(Ethoxycarbonyl)maleinimid nach kurzer Zeit vollständig auf, während die Titelverbindung im Verlauf der Umsetzung ausfällt. Es werden 40 ml THF zugegeben und 45 min bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach stellt man mit 1 n HCl auf pH 6.0, extrahiert mit zweimal je 50 ml Essigester und trocknet den Extrakt mit 5 g Na_2SO_4 . Nach Eindampfen im Wasserstrahlvakuum wird die Titelverbindung als farbloser, fester Rückstand erhalten.

Ausbeute: 1.1 g (92 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Chloroform/Essigester (66/33 v/v), Besprühen mit 0.1 % KMnO_4 -Lsg.; $R_f = 0.50$.

DC: Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 v/v/v), Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); R_f = 0.22.

$C_6H_9ClN_2O_2$ (176.60); Ber.: C 40.81 H 5.14 N 15.86
Gef.: C 40.60 H 5.29 N 15.46

b) 5-(N-Maleinimido)pentylamin-Hydrochlorid

8.46 g (30 mmol) der nach Beispiel 2b hergestellten BOC-Amino-
verbindung werden in 100 ml 2 M HCL in Dioxan gelöst und bei
Raumtemperatur stehen gelassen. Innerhalb 30-60 min beginnt das
Produkt auszufallen. Man läßt 24 h bei Raumtemperatur stehen,
dann saugt man das Kristallisat ab, wäscht mit ca 50 ml Essi-
gester nach und trocknet im Exsikkator über $CaCl_2$ und Paraf-
fin.

Ausbeute: 4.7 g farbloses, feinkristallines Pulver (entspr. 72%
d.Th.)

DC: Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 (v/v/v),
Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt);
 R_f 0.22

$C_9H_{15}ClN_2O_2$ (218.69); Ber.: C 49.43 H 9.91 N 12.81
Gef.: C 49.19 H 9.99 N 12.59

Beispiel 4 Herstellung von Hapten-Carbonsäure-Derivaten

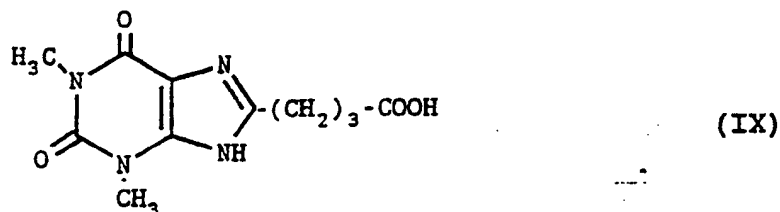
Die folgenden Haptencarbonsäuren wurden nach Literaturvorschriften
hergestellt:

a) Cortisol-3-(O-carboxymethyl)-oxim

aus Cortisol und Carboxymethylhydroxylamin-hemihydrochlorid in
Ethanol

Lit.: A. Tsuji et al., Steroids 24 (1974), 739-51

- 19 -

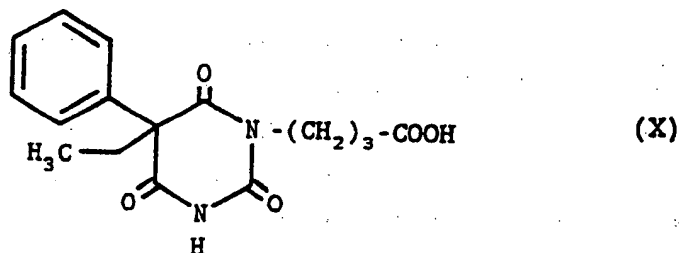


e) 5-Ethyl-5-phenyl-1-(3-carboxypropyl)barbitursäure
 (1-(3-Carboxypropyl)-phenobarbital)

aus Natriumphenobarbital und 4-Brombuttersäure-ethylester

C.E. Cook et al., Quantitative Analogical Studies in Epilepsy

P. Kellaway und Ingemar Petersen (ed.), Raven Press, New York
 1976, S.39-58.



Beispiel 5 Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester

Allgemeine Herstellvorschrift

0.5 mmol der nach Beispielen 4 a,b,d,e hergestellten Hapten-Carbonsäuren werden zusammen mit 63 mg (0.55 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 10 ml absolutem DMF gelöst und mit 1.13 mg (0.55 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Man läßt 4 h bei Raumtemperatur rühren, filtriert und dampft die Lösung im Vakuum ein. Der Rückstand wird in 20 ml THF aufgenommen und eventuell unlösliche Reste an N,N'-Dicyclohexylharnstoff durch Filtration entfernt. Die Lösungen der Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester werden in dieser Form zur nächsten Stufe eingesetzt.

DC: Kieselgel, Essigester/Petrolether/Ethanol (40/40/20 v/v/v);
 $R_f = 0.58$.

$C_{33}H_{44}N_2O_9$ (612.71); Ber.: C 64.69 H 7.24 N 4.57
 Gef.: C 64.60 H 7.44 N 4.29

c) 2-(N-Maleinimido)ethylamid von Digoxin-4'''-glutaryl-hydroxy-succinimidester

Eluent: Essigester/Petrolether/Methanol (40/40/20 v/v/v).

Ausbeute: 220 mg (43 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Essigester/Petrolether/Methanol (40/40/20 v/v/v);

$R_f = 0.48$.

$C_{52}H_{76}N_2O_{18}$ (1017.15); Ber.: C 61.40 H 7.53 N 2.75
 Gef.: C 61.31 H 7.68 N 2.50

d) 2-(N-Maleinimido)ethylamid von 8-(3-Carboxypropyl)-theophyllin

Ausbeute: 120 mg (62 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 v/v/v);

$R_f = 0.79$.

$C_{17}H_{20}N_6O_5$ (388.38); Ber.: C 52.57 H 5.19 N 21.64
 C 52.41 H 5.01 N 21.74

e) 2-(N-Maleinimido)ethylamid von 1-(3-Carboxypropyl)-phenobarbital

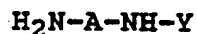
Ausbeute: 95 mg (44% d.Th.)

DC: Kieselgel, Essigester/Methanol (90/10 v/v); $R_f=0.83$

$C_{22}H_{24}N_4O_6$ (440.46); Ber.: C 59.99 H 5.49 N 12.72
 59.60 5.79 12.55

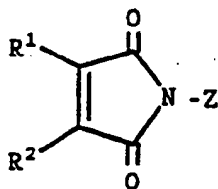
Beispiel 8Synthese von Cortisol-3-carbonsäure-[2-(N-maleinimido)ethylamid]-
B-Gal-Immunogen

500 mg B-Gal (Boehringer Mannheim Nr. 570 079) werden bei 20°C in 50 ml 0.1 n Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 gelöst und mit 110 mg der nach Beispiel 4a hergestellten Cortisol-Verbindung in 10 ml Dioxan unter kräftigem Rühren tropfenweise versetzt. Nach beendeter Zugabe läßt man ca. 16 hiterrühren, dann wird die Lösung auf eine ACA 202 Ultrogel-Säule (800 ml Volumen) aufgegeben und mit 0.01 n Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 0.9% NaCl eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen werden gesammelt und die Konzentration durch UV-Absorption bei 280 nm (Proteinkonzentration = $E \times 1.9$ mg/ml) bestimmt. Die Ausbeute an Immunogen liegt typischerweise bei 350 bis 450 mg. Das Proteinkonjugat wird lyophilisiert und bei -20°C aufbewahrt.



(IV),

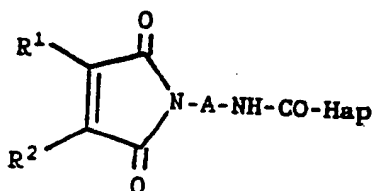
überführt, wobei Y eine leicht abspaltbare Schutzgruppe darstellt, und anschließend die Verbindung der allgemeinen Formel IV mit einer Verbindung der allgemeinen Formel V



(V),

in der R_1 und R_2 die oben angegebenen Bedeutungen haben und Z eine reaktive Gruppe bedeutet, nach an sich bekannten Verfahren umgesetzt, und anschließend die Schutzgruppe Y wieder abspaltet.

5. Amidoalkyl-maleimide der allgemeinen Formel II



(II),

in der Hap der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen oder Carboxylderivate tragenden Hapten oder Antigen durch Amidierung gebildete Rest ist, R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe oder ein Wasserstoffatom bedeuten, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder Carbonylgruppe unterbrochene Alkylengruppe mit 2-6 C-Atomen darstellt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP90/00957

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl ⁵ : C07D 207/452, G01N 33/535, G01N 33/547		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl ⁵	C07D 207/00, G01N 33/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	EP, A, 0142193 (AKZO) 22 May 1985 see pages 17,18, example 4 cited in the application	1-17
A	Chemical Abstracts, Volume 93, No. 19, 10 November 1980, (Columbus, Ohio, US), P. Singh et al.: "A solid support for affinity chromatography that covalently binds thiol groups via a cleavable connector arm", see page 294, abstract 182140w, & Arch.Biochem. Biophys. 1980, 203(2), 774-9 cited in the application	1
A	EP, A, 0178125 (MALLINCKRODT) 16 April 1986 see the whole document	1-17
A	EP, A, 0158291 (TAKEDA) 16 October 1985 see the whole document ; in particular page 15	1-17
A	DE, A, 2310118 (CASELLA) 12 September 1974 see claims 1-5	1-4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
7 September 1990 (07.09.90)		8 October 1990 (08.10.90)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
European Patent Office		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 90/00957**

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl.⁵ C 07 D 207/452, G 01 N 33/535, G 01 N 33/547														
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: right; padding-right: 20px;">Recherchierte Mindestprüfstoff⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C 07 D 207/00, G 01 N 33/00</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; padding-top: 5px;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸</div>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int.Cl.⁵	C 07 D 207/00, G 01 N 33/00								
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole													
Int.Cl.⁵	C 07 D 207/00, G 01 N 33/00													
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr.¹</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0142193 (AKZO) 22. Mai 1985 siehe Seiten 17,18, Beispiel 4 in der Anmeldung erwähnt --</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1-17</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstracts, Band 93, Nr. 19, 10. November 1980, (Columbus, Ohio, US), P. Singh et al.: "A solid support for affinity chromatography that covalently binds thiol groups via a cleavable connector arm", siehe Seite 294, Zusammenfassung 182140w, & Arch. Biochem. Biophys. 1980, 203(2), 774-9 in der Anmeldung erwähnt --</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0178125 (MALLINCKRODT) 16. April 1986 siehe das ganze Dokument -- ./.</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1-17</td> </tr> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹	X	EP, A, 0142193 (AKZO) 22. Mai 1985 siehe Seiten 17,18, Beispiel 4 in der Anmeldung erwähnt --	1-17	A	Chemical Abstracts, Band 93, Nr. 19, 10. November 1980, (Columbus, Ohio, US), P. Singh et al.: "A solid support for affinity chromatography that covalently binds thiol groups via a cleavable connector arm", siehe Seite 294, Zusammenfassung 182140w, & Arch. Biochem. Biophys. 1980, 203(2), 774-9 in der Anmeldung erwähnt --	1	A	EP, A, 0178125 (MALLINCKRODT) 16. April 1986 siehe das ganze Dokument -- ./.	1-17
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹												
X	EP, A, 0142193 (AKZO) 22. Mai 1985 siehe Seiten 17,18, Beispiel 4 in der Anmeldung erwähnt --	1-17												
A	Chemical Abstracts, Band 93, Nr. 19, 10. November 1980, (Columbus, Ohio, US), P. Singh et al.: "A solid support for affinity chromatography that covalently binds thiol groups via a cleavable connector arm", siehe Seite 294, Zusammenfassung 182140w, & Arch. Biochem. Biophys. 1980, 203(2), 774-9 in der Anmeldung erwähnt --	1												
A	EP, A, 0178125 (MALLINCKRODT) 16. April 1986 siehe das ganze Dokument -- ./.	1-17												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>														
IV. BESCHEINIGUNG <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. September 1990</td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 08. 10. 90</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt</td> <td style="padding: 5px;">Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten H. Ballesteros</td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. September 1990	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 08. 10. 90	Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten H. Ballesteros								
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. September 1990	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 08. 10. 90													
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten H. Ballesteros													

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9000957

SA 37530

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 27/09/90

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0142193	22-05-85	AU-A- 3449784	26-04-85
		AU-A- 3449884	26-04-85
		EP-A- 0142192	22-05-85
		JP-A- 60172932	06-09-85
		JP-A- 60172933	06-09-85
EP-A- 0178125	16-04-86	US-A- 4659839	21-04-87
		AU-B- 598183	21-06-90
		AU-A- 4845185	17-04-86
		CA-A- 1257601	18-07-89
		JP-A- 61093131	12-05-86
EP-A- 0158291	16-10-85	JP-A- 60214259	26-10-85
		JP-A- 60214260	26-10-85
		JP-A- 60214261	26-10-85
		US-A- 4816390	28-03-89
DE-A- 2310118	12-09-74	Keine	